

Халымбаджа Игорь Алексеевич

**СИНТЕЗ ^2H , ^{13}C , ^{15}N -МЕЧЕНЫХ
АЗОЛО [5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИНОВ
И АЗОЛО[1,5-*a*]ПИРИМИДИНОВ**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Екатеринбург – 2013

Работа выполнена на кафедре органической химии Химико-технологического института
ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина»

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ: **Русинов Владимир Леонидович**,
доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН;
Деев Сергей Леонидович,
кандидат химических наук.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: **Шереметев Алексей Борисович**,
доктор химических наук, ФГБУН Институт
органической химии им. Н.Д. Зелинского
РАН, Москва, старший научный сотрудник
лаборатории азотсодержащих соединений;
Иргашев Роман Ахметович,
кандидат химических наук, ФГБУН Инсти-
тут органического синтеза им. И.Я. Постов-
ского РАН, научный сотрудник лаборато-
рии гетероциклических соединений, Екате-
ринбург.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский госу-
дарственный технологический институт
(технический университет)».

Защита состоится «02» декабря 2013 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета
Д 212.258.08 на базе ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира 28, третий
учебный корпус, аудитория Х-420.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный
университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Автореферат разослан « » октября 2013 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук, с.н.с.

Т.А. Поспелова

Актуальность темы. Среди производных азолоазинов найдены структуры, представляющие интерес в качестве высокоэнергетических соединений и органических лигандов. Особенно актуально использование гетероциклических систем, полученных на основе тетразолов и 1,2,4-триазинов. С другой стороны, интерес к синтезу данного класса соединений обусловлен поиском новых биологически активных молекул, обладающих различным спектром действия. Перспективность этого направления работ подтверждается достигнутыми результатами: натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (триазавирин) оказалась эффективным противовирусным средством в отношении различных типов вируса гриппа, включая птичий и свиной грипп. Представленные данные делают актуальными исследования в области азолотриазинов и азолопиримидинов. Однако, наряду с разработкой методов синтеза и функционализации, одной из важных задач для данного класса соединений остается разработка методов исследования строения и путей трансформации. Возникновение этой проблемы связано с большим содержанием атомов азота и небольшим количеством атомов углерода и водорода в структуре. В связи с этим, использование традиционных методов ЯМР-спектроскопии ($1D$ ^{13}C , ^{15}N спектров, а также $2D$ 1H - ^{13}C HMBC, 1H - ^{13}C HSQC, 1H - 1H COSY экспериментов) зачастую является малоэффективным. В этом случае химики-синтетики предпочитают использовать рентгеноструктурный анализ (РСА), который дает информацию о строении только в кристалле. Кроме того, не всегда можно получить подходящий образец для исследования; также РСА не позволяет проследить за кольчато-цепными превращениями, процессами изомеризации, таутомерными переходами и различными перегруппировками (Димрота, ANRORC и др.), к которым склонны конденсированные азолоазины. Вместе с тем, включение в структуру азолотриазинов и азолопиримидинов атомов 2H , ^{13}C , ^{15}N приводит к появлению дополнительных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ), что значительно расширяет возможности ЯМР-спектроскопии для установления строения и исследования путей трансформации азотсодержащих конденсированных гетероциклов. Кроме того, появление сигналов меченых атомов в $1D$ ^{13}C и ^{15}N ЯМР-спектрах также облегчает структурный анализ различных типов гетероциклов и продуктов их превращений. Введение стабильных изотопов в структуру биологически активных азолоазинов используется для исследования вопросов фармакокинетики и путей метаболизма при создании новых лекарственных препаратов. Поэтому разработка методов получения и синтез обогащенных атомами 2H , ^{13}C , ^{15}N конденсированных азоло-1,2,4-триазинов и азолопиримидинов, а также использование их в исследовании особенностей строения и превращений является актуальной задачей.

Цели и задачи исследования. Целями данной работы являются:

- создание эффективных методов селективного введения стабильных изотопов 2H , ^{13}C и ^{15}N в молекулу азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов, включая структуры, обладающие биологической активностью;
 - разработка на основе анализа КССВ 1H - ^{15}N и ^{13}C - ^{15}N методов исследования особенностей строения и трансформаций полиазотистых гетероциклов.
- Задачи, решаемые в ходе исследования:
- получение селективно меченых азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов, в том числе противовирусного препарата триазавирин;
 - установление структуры и особенностей превращений азоло[1,5-а]пиримидинов и азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов в растворах (азидо-тетразольной таутомерии, трансликозилирования, перегруппировки Димрота);

- сопоставление полученных результатов с данными РСА.

Научная новизна работы. Предложены общие методы включения атомов ^2H , ^{13}C и ^{15}N в структуру производных 6-нитро- и 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинов и 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов. На примере производных тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина и дизамещенных тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов показано, что дальние гетероядерные константы ^1H – ^{15}N могут быть использованы в исследованиях азидо-тетразольных равновесий. Продемонстрировано, что комплексный анализ КССВ ^1H – ^{15}N , ^{13}C – ^{15}N и химических сдвигов меченых атомов азота ^{15}N позволяет эффективно исследовать различные типы трансформаций, которые приводят к образованию изомерных структур (азидо-тетразольное равновесие и перегруппировка Димрота). С использованием ^{15}N обогащенных производных исследованы закономерности реакции гликозилирования 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов и взаимодействия 2-галогенпиримидинов с азидом натрия. Обнаружена перегруппировка Димрота в ряду аннелированных тетразолоазинов.

Практическая значимость. Разработаны препаративные методы получения меченых производных 6-нитро- и 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов и 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов. Получены образцы триазавирина, содержащего различную комбинацию стабильных изотопов ^2H , ^{13}C и ^{15}N . На основе полученных образцов возможны разработка методов количественного и качественного анализа лекарственных форм триазавирина, исследование его фармакокинетики и фармакодинамики, а также установление механизма биологического действия. Предложен эффективный метод исследования азидо-тетразольной таутомерии и других трансформаций полициклических азотсодержащих гетероциклов, основанный на анализе дальних КССВ ^1H – ^{15}N . Получены данные о деталях гликозилирования 6-фенилзамещенных 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов с использованием селективно меченых изотопом ^{15}N образцов.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 7 тезисов. Отдельные части работы докладывались на международных конференциях: International Congress on Organic Chemistry, (Kazan, Russia, 2011), Техническая химия: от теории к практике (Пермь, 2012), Новые направления в химии гетероциклических соединений (Пятигорск, 2013) и всероссийских конференциях: Актуальные проблемы органического синтеза и анализа (Екатеринбург, 2010), XIV конференция по органической химии (Екатеринбург, 2011), Органический синтез: химия и технология (Екатеринбург, 2012), Всероссийская конференция по органической химии, посвященная 200-летию со дня рождения Н. Н. Зинина (Санкт-Петербург, 2013).

Объем диссертации. Диссертация изложена на страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов. Материал иллюстрирован 11 таблицами, 18 рисунками и 19 схемами. Список цитированной литературы включает наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракты П2444 от 19.11.2009 и 14.А18.21.0806 в рамках программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и госконтракт Н687 42Г 007/12), и грантов Российского фонда фундаментальных исследований (номера проектов 10-03-01007 и 12-03-31476), а также при поддержке гранта для молодых ученых УрФУ.

Выражаю благодарность академику О. Н. Чупахину за постоянное внимание и ценные советы, сотрудникам кафедры органической химии, принявшим участие в работе, а также сотрудникам кафедры ТОС О. С. Ельцову и Т. С. Штукиной, ИБХ РАН (Москва) А. С. Арсеньеву и З. О. Шенкареву за проведение ЯМР-исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Литературный обзор «Использование констант спин-спинового взаимодействия для установления строения гетероциклических соединений»

Глава включает обзор литературных данных по использованию меченных изотопом ^{15}N соединений для установления структуры гетероциклических соединений при помощи анализа КССВ ^1H – ^{15}N и ^{13}C – ^{15}N . В обзоре показано, что данный метод позволяет решать большинство задач органического анализа.

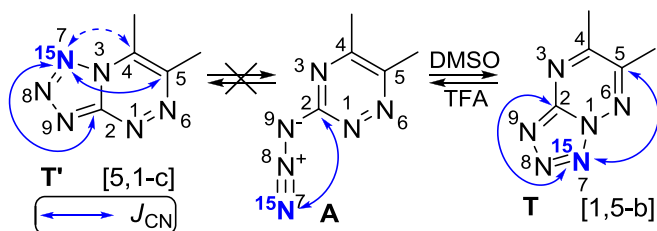
2. Результаты и обсуждение.

2.1. Обогащенные изотопом ^{15}N производные тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и тетразоло[1,5-а]пиримидинов*

2.1.1. Исследование азидо-тетразольного равновесия на основе анализа дальних констант ^1H – ^{15}N

2.1.1.1. Синтез на основе обогащенной азотистой кислоты

Одним из методов синтеза тетразолоазинов является взаимодействие HNO_2 с гетарил-гидразинами, в которых заместитель NH-NH_2 присоединен к углероду, находящемуся в α -положении к гетероциклическому азоту. Благодаря азидо-тетразольной таутомерии, образующиеся азида циклизуются в тетразолоазины. Ранее этот подход позволил ввести атом ^{15}N



Тетразол **T** и азид **A** характеризуются двумя и одной КССВ ^{13}C – ^{15}N соответственно. В случае образования **T'** в ЯМР-спектре должна была фиксироваться дополнительная $^2J_{\text{CN}}$, указанная пунктирной стрелкой.

Схема 1. Анализ J_{CN} в исследовании азидо-тетразольного равновесия.

тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазины **T'** (схема 1). Однако существенным недостатком анализа J_{CN} является низкая чувствительность углеродных спектров.

Нами разработан альтернативный подход для исследования азидо-тетразольных превращений, основанный на анализе дальних констант ^1H – ^{15}N (J_{HN}). В качестве объектов исследования были выбраны производные тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и тетразоло[1,5-а]пиримидинов, по литературным данным существующие в растворе сразу в двух циклических формах.

С использованием в качестве гетарилгидразина соединения **1** и меченой азотистой кислоты, генерированной из $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ (обогащение по ^{15}N 98%), был получен азид **2A**– ^{15}N . Реак-

в азольный цикл тетразоло[1,5-*b*][1,2,4]триазинов **T**, а анализ КССВ ^{13}C – ^{15}N (J_{CN}) оказался эффективным для исследования азидо-тетразольного равновесия в данном ряду соединений¹. В результате, для соединения **T** удалось доказать [1,5-*b*] тип аннелирования между тетразольным и 1,2,4-триазиновыми циклами, зафиксировать образование азида **A** и показать, что изомеризация не приводит к тетра-

* Результаты, представленные в части 2.1. настоящей работы получены в сотрудничестве с Институтом биоорганической химии (Москва).

¹ Deev S.L., Shenkarev Z.O., Shestakova T.S., Chupakhin O.N., Rusinov V.L., Arseniev A.S. // *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 8487–8497.

ция протекала при обработке гидразина **1** раствором $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ при 0°C в уксусной кислоте. Азид **2A**- ^{15}N в растворе DMSO-d_6 спонтанно циклизуется в тетразольные изомеры **2T**- ^{15}N и **2T'**- ^{15}N (схема 2). Как и ожидалось, изомерный состав полученного образца изменялся в зависимости от природы растворителя. Для наблюдения кольчато-цепных превращений использовали DMSO-d_6 , TFA-d и их смесь в различных соотношениях (табл. 1).

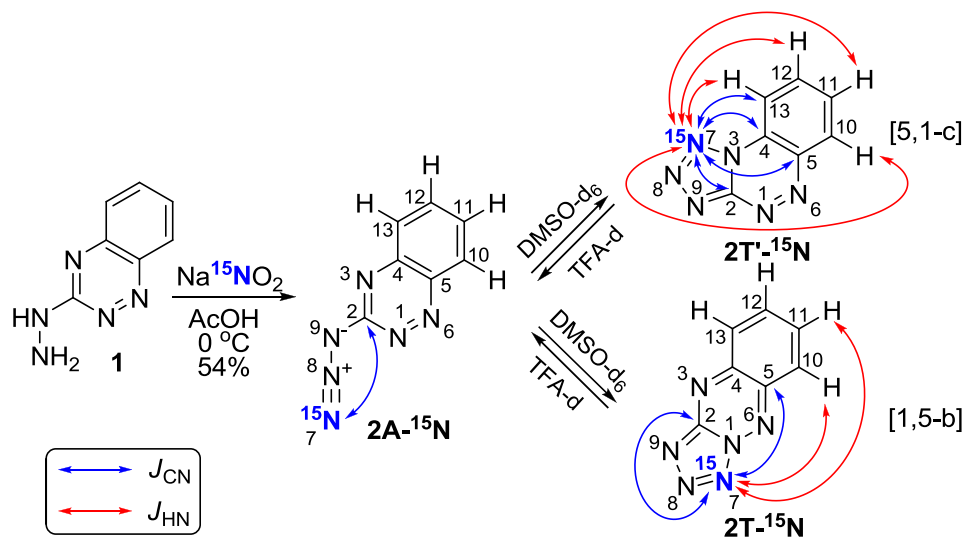


Схема 2. Синтез соединений **2A**- ^{15}N , **2T**- ^{15}N и **2T'**- ^{15}N .

Первоначальный вывод о строении изомеров в растворе DMSO-d_6 был сделан на основании анализа химических сдвигов меченых атомов азота в 1D ^{15}N ЯМР-спектре, зарегистрированном в DMSO-d_6 (рис 1А, табл. 2). Сигналы в области -36 м.д ... -30 м.д соответствуют тетразолотриазинам **2T**- ^{15}N и **2T'**- ^{15}N , а синглет с химическим сдвигом -40.3 м.д. отнесен к атому $^{15}\text{N}7$ **2A**- ^{15}N . При этом можно предположить, что сигнал $\delta -31.0$ м.д. соответствует соединению **2T**- ^{15}N , минорному циклическому изомеру. О существовании в растворе трех изомеров свидетельствуют также данные ^1H ЯМР (рис. 1В).

Для однозначного подтверждения строения соединения **2T'**- ^{15}N и отнесения сигналов в 1D ^{15}N ЯМР-спектре были проведены эксперименты по анализу КССВ ^1H - ^{15}N . Для этих целей были использованы эксперименты спин-эхо, которые показали, что все протоны бензольного фрагмента в соединении **2T'**- ^{15}N взаимодействуют с меченым атомом азота (табл. 2, схема 2). Наибольшее значение дальних констант зафиксировано у сигналов атомов H10 (0.11 Гц) и H13 (0.16 Гц). В случае атомов H11 и H12 величины констант $J_{\text{H-}^{15}\text{N}7}$ составили ≈ 0.04 Гц. Для основного изомера **2T**- ^{15}N КССВ между меченым атомом азота и ароматическими протонами зафиксированы в 2D ^1H - ^{15}N НМВС-спектре (рис. 1С). Однако, в этом случае невозможно провести корреляцию между интенсивностью кросс-пиков и амплитудой J_{NH} , а, следовательно, однозначно подтвердить структуру основного изомера.

В свою очередь, результаты измерений КССВ ^{13}C - ^{15}N согласуются с выводами о строении структуры **2T'**- ^{15}N , сделанными на основании анализа гетероядерных взаимодействий ^1H - ^{15}N . Так, в 1D ^{13}C спектре вещества **2T'**- ^{15}N наблюдались константы ^{13}C - ^{15}N у атомов углерода C2 ($^2J_{\text{CN}} = 2.2$ Гц), C4 ($^2J_{\text{CN}} = 2.6$ Гц), C5 ($^3J_{\text{CN}} = 0.6$ Гц) и C13 ($^3J_{\text{CN}} = 0.6$ Гц).

Табл. 1. Азидо-тетразольное равновесие **2**- ^{15}N в различных растворителях.

Растворитель	T' : A : T
DMSO-d_6	79 : 12 : 9
$\text{DMSO-d}_6/\text{TFA-d}$ (9:1)	75 : 13 : 12
$\text{DMSO-d}_6/\text{TFA-d}$ (3:1)	70 : 19 : 11
TFA-d	1 : 99 : 0

Важно отметить, что J_{NH} и J_{CN} для двух других изомеров $2\text{T-}^{15}\text{N}$ и $2\text{A-}^{15}\text{N}$ определить не удалось из-за уширения сигналов в протонных и углеродных спектрах. Подобное поведение может быть объяснено процессом динамического превращения циклической формы $2\text{T-}^{15}\text{N}$ в азид $2\text{A-}^{15}\text{N}$.

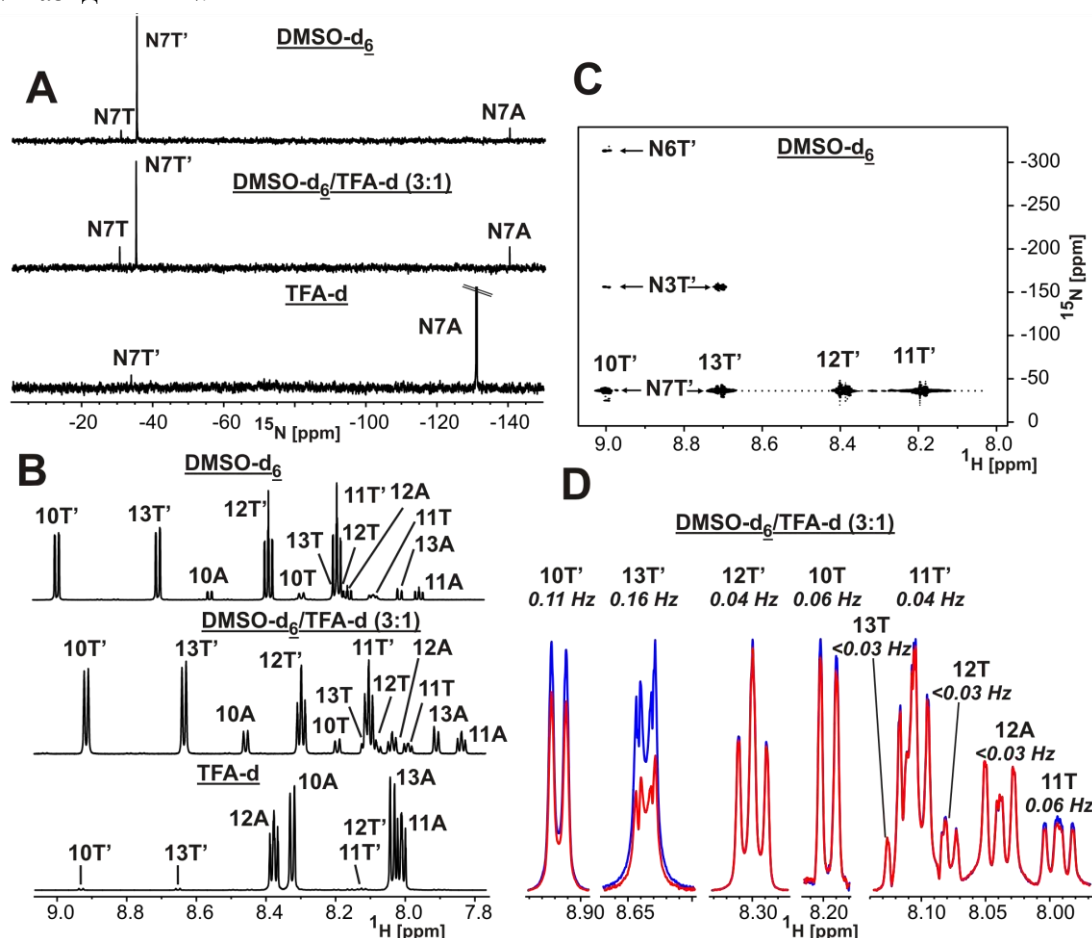


Рис. 1. ЯМР-спектры смеси изомеров $2\text{A-}^{15}\text{N}$, $2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$ и $2\text{T-}^{15}\text{N}$ в различных растворителях. (А и В). 1D ^1H и ^{15}N спектры, записанные в DMSO-d_6 , TFA-d и в смеси $\text{DMSO-d}_6/\text{TFA-d}$ (3:1); (С) 2D ^1H - ^{15}N HMBC спектр в DMSO-d_6 ; (D) фрагменты 1D ^1H ЯМР-спектров, записанных в условиях экспериментов спин-эхо, а указанные J_{NH} измерены с селективной инверсией намагниченности ядер $^{15}\text{N7T}$ и $^{15}\text{N7T}'$ (красный) или $^{15}\text{N7A}$ (синий). Спектры зарегистрированы в $\text{DMSO-d}_6/\text{TFA-d}$ (3:1). Сигналы, отмеченные < 0.03 Гц, не имели КССВ $^1\text{H-}^{15}\text{N}$.

Добавление дейтерированной трифторуксусной кислоты к DMSO-d_6 привело к увеличению концентрации минорных изомеров $2\text{T-}^{15}\text{N}$ и $2\text{A-}^{15}\text{N}$ и уменьшению уширения сигналов, что позволило проанализировать КССВ $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ и $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$. Константы $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ были измерены при соотношении DMSO-d_6 и TFA-d 9:1. Так, в азиде $2\text{A-}^{15}\text{N}$ спин-спиновое взаимодействие с меченым атомом азота наблюдалось только для атома C2 ($^3J_{\text{CN}} = 0.4$ Гц) (схема 2). Тогда как для тетразольного изомера $2\text{T-}^{15}\text{N}$ наличие J_{CN} было зафиксировано у сигналов атомов C2 ($^2J_{\text{CN}} = 3.2$ Гц) и C5 ($^3J_{\text{CN}} = 1.2$ Гц). Константы $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ для изомера $2\text{T-}^{15}\text{N}$ удалось количественно определить при соотношении DMSO-d_6 и TFA-d 3:1 (рис. 1D). В этом случае J_{NH} были зафиксированы у сигналов H10 и H11 (табл. 2, схема 2). Такая спектральная картина полностью подтверждает способ аннелирования между тетразольным и 1,2,4-триазиновым циклами как [1,5-*b*].

Табл. 2. Химические сдвиги (м.д.) и КССВ (Гц) ядер ^1H и ^{15}N в соединениях $2\text{-}^{15}\text{N}$.

Соединение	растворитель	$\delta^{15}\text{N}^a$	$\delta^1\text{H}^b$			
			H10	H11	H12	H13
$2\text{A-}^{15}\text{N}$	DMSO- d_6	-140.3 (N7)	8.56	7.96	8.17	8.02
	DMSO- d_6 /TFA-d (9:1)	-140.3 (N7)	8.52	7.92	8.12	7.98
	DMSO- d_6 /TFA-d (3:1)	-140.2 (N7)	8.46	7.84	8.04	7.91
	TFA-d	-130.9 (N7)	8.33	8.01	8.38	8.04
$2\text{T-}^{15}\text{N}^c$	DMSO- d_6	-31.0 (N7) ^c	8.30 ^c	8.09 ^c	8.20 ^d	8.20 ^d
	DMSO- d_6 /TFA-d (9:1)	-30.9 (N7)	8.26	8.06	8.15 ^d	8.17 ^d
	DMSO- d_6 /TFA-d (3:1)	-30.6 (N7)	8.19	7.99	8.08 ^d	8.11 ^d
			$^5J_{\text{NH}} 0.06$	$^6J_{\text{NH}} 0.06$		
$2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$	DMSO- d_6	-35.5 (N7)	9.00	8.20	8.39	8.71
			$^5J_{\text{NH}} 0.11$	$^6J_{\text{NH}} 0.04$	$^5J_{\text{NH}} 0.04$	$^4J_{\text{NH}} 0.15$
	DMSO- d_6 /TFA-d (9:1)	-35.4 (N7)	8.97	8.17	8.36	8.69
	DMSO- d_6 /TFA-d (3:1)	-35.3 (N7)	8.92	8.10	8.30	8.64
			$^5J_{\text{NH}} 0.11$	$^6J_{\text{NH}} 0.04$	$^5J_{\text{NH}} 0.04$	$^4J_{\text{NH}} 0.16$
	TFA-d	-33.9 (N7)	8.93	8.13	8.13	8.65
			$^5J_{\text{NH}} 0.13$	— ^e	— ^e	$^4J_{\text{NH}} 0.17$

^aЗдесь и далее химические сдвиги в ^{15}N ЯМР-спектрах измерены относительно нитрометана. ^bКССВ ^1H – ^{15}N были измерены методом модулированного спин-эхо. Ошибка при измерении J_{NH} составила 0.02 и 0.05 Гц соответственно. ^cСигналы соединения не наблюдались в TFA-d. ^dСигнал уширен. ^eСигнал перекрывается с сигналом H11 соединения $2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$. ^fСигнал не определен из-за перекрывания.

Регистрация спектра образца, полученного взаимодействием гидразино-1,2,4-триазина **1** с ^{15}N -азотистой кислотой, в чистой TFA-d показала, что в растворе присутствуют два соединения $2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$ и $2\text{A-}^{15}\text{N}$ в соотношении 1:99 соответственно (табл. 1). Строение соединения $2\text{A-}^{15}\text{N}$ подтверждается наличием $^3J_{\text{CN}} 0.6$ Гц у сигнала атома C2 (схема 2), отсутствием спин-спиновых взаимодействий ^1H – $^{15}\text{N}7$ и химическим сдвигом атома $^{15}\text{N}7$ в 1D ^{15}N ЯМР-спектре (табл. 2, рис. 1А). Низкая концентрация изомера $2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$ не позволила провести измерения КССВ ^{13}C – ^{15}N , поэтому для однозначного установления способа аннелирования

Табл. 3. Азидо-тетразольное равновесие $4\text{-}^{15}\text{N}$ в различных растворителях

Растворитель	$\text{T}' : \text{A} : \text{T}$
DMSO- d_6^a	8 : 0 : 92
DMSO- d_6^b	51 : 0 : 49
DMSO- d_6 /TFA-d (3:1)	49 : 0 : 51
DMSO- d_6 /TFA-d (1:1)	47 : 2 : 51
DMSO- d_6 /TFA-d (2:3)	24 : 29 : 47
TFA-d	0 : 96 : 4

^aСразу после растворения. ^bЧерез 24 часа после растворения при 30 °С.

между тетразольным и азиновым циклом был использован анализ дальних констант ^1H – ^{15}N . Присутствие гетероядерных взаимодействий у атомов H10 ($^5J_{\text{NH}} = 0.13$ Гц) и H11 ($^4J_{\text{NH}} = 0.17$ Гц) подтверждает структуру $2\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$.

При обработке гетарилгидразина **3** меченой азотистой кислотой, генерированной из K^{15}NO_2 (^{15}N , 86%), нами был получен азид $4\text{A-}^{15}\text{N}$, спонтанно циклизующийся в тетразольные изомеры $4\text{T-}^{15}\text{N}$ и $4\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$ (схема 3) в растворе DMSO. Этот вывод был сделан на основании значений хими-

ческих сдвигов ядер $^{15}\text{N}7$ (табл. 3), которые регистрировались в области, характерной для тетразолоазинов. Анализ интегральных интенсивностей сигналов в 1D ^1H и ^{15}N ЯМР-спектрах позволил проследить за взаимным превращением двух изомеров. Так, сразу после растворения продукта взаимодействия гетарилгидразина **3** с меченой азотистой кислотой, соотношение между $4\text{T-}^{15}\text{N}$ и $4\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}$ было определено как 92:8 (табл. 3). В дальнейшем

наблюдалось быстрое увеличение концентрации соединения **4T'**-¹⁵N, и уже через сутки соотношение между тетразольными формами **4T**-¹⁵N и **4T'**-¹⁵N составило 49:51 (табл. 3).

Табл. 4. Химические сдвиги (м.д.) и КССВ (Гц) ядер ¹H и ¹⁵N в соединениях **4**-¹⁵N.

Соединение	растворитель	δ ¹⁵ N	δ ¹ H ^a	
			H5	H6'
4A - ¹⁵ N ^б	DMSO-d ₆ /TFA-d (2:3)	-134.4 (N7)	6.34	2.24
	TFA-d	-131.0 (N7)	6.33	2.24
4T - ¹⁵ N	DMSO-d ₆	-34.7 (N7) -155.5 (N1)	6.30 ^а ⁴ J _{NH} 0.6	2.62 ⁴ J _{NH} 0.2
	DMSO-d ₆ /TFA-d (3:1)	-34.8 (N7)	6.17	2.56
	DMSO-d ₆ /TFA-d (2:3)	-34.2 (N7)	6.05 ⁴ J _{NH} 0.6	2.47 ⁴ J _{NH} 0.2
	TFA-d	-32.9 (N7)	6.22 ⁴ J _{NH} 0.7	2.51 ⁴ J _{NH} 0.2
		-154.9 (N1)		
4T' - ¹⁵ N ^с	DMSO-d ₆	-33.8 (N7)	5.94 ⁴ J _{NH} 0.6	2.38
	DMSO-d ₆ /TFA-d (3:1)	-33.8 (N7)	5.81	2.33
	DMSO-d ₆ /TFA-d (2:3)	-34.5 (N7)	5.67 ⁴ J _{NH} 0.6	2.22

^aКССВ ¹H-¹⁵N были измерены методом модулированного спин-эхо. Ошибка при измерении ⁴J_{NH} составила 0.02 и 0.05 Гц соответственно. ^бСигнал соединения не наблюдался в DMSO-d₆ и в DMSO-d₆/TFA-d (3:1). ^сСигнал уширен. ^сСигналы соединения не наблюдались в TFA-d.

В 2D ¹H-¹⁵N HMBC-спектре смеси тетразольных изомеров **4T**-¹⁵N и **4T'**-¹⁵N наблюдаются кросс-пики между меченым атомом азота ¹⁵N7 и протонами азинового фрагмента, что напрямую указывает на наличие дальних ¹H-¹⁵N спин-спиновых взаимодействий между соответствующими ядрами. Однако значительное уширение ¹H сигналов в спектре соединения **4T**-¹⁵N, вероятно, вызванное процессами химического обмена, не позволило провести анализ величины наблюдаемых ⁴J_{NH} и сделать какие-либо выводы о строении тетразольных изомеров, образующихся при циклизации азида **4A**-¹⁵N. Для количественного измерения наблюдаемых КССВ ¹H-¹⁵N были использованы амплитудно-модулированные 1D ¹H спин-эхо эксперименты, включающие селективную инверсию намагниченности ядер ¹⁵N. Измеренные значения дальних ⁴J_{NH} (табл. 4) позволили установить строение соединений **4T**-¹⁵N и **4T'**-¹⁵N (схема 3). Так, наличие ¹H-¹⁵N спин-спинового взаимодействия протона H5 и протонов метильной группы при атоме C6' с меченым атомом азота доказывает, что циклизация соединения **4A**-¹⁵N в тетразольный изомер **4T**-¹⁵N протекает с участием атома N1 пиримидинового цикла. В случае структуры **4T'**-¹⁵N, способ аннелирования тетразольного цикла подтверждается наблюдением единственной ⁴J_{NH} между протоном H5 и азотом N7.

Вывод о строении соединений **4T**-¹⁵N и **4T'**-¹⁵N хорошо согласуется с КССВ ¹³C-¹⁵N. Так, в спектре 1D ¹³C ЯМР смеси тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов для сигналов C2 (²J_{CN} = 2.4 Гц), C4 (²J_{CN} = 2.1 Гц), C5 (³J_{CN} = 0.8 Гц) и C6 (⁴J_{CN} = 0.4 Гц) соединения **4T'**-¹⁵N наблюдаются спин-спиновые взаимодействия с ядром ¹⁵N7 (схема 3). Наличие взаимодействия между C4 и ¹⁵N7 доказывает участие атома N3 в образовании тетразольного изомера. В случае изомера **4T**-¹⁵N, ²J_{CN} наблюдается только у сигналов двух атомов C6 и C6' (²J_{CN} = 3.4 Гц и ³J_{CN} = 0.8 Гц соответственно). Ожидаемые константы у C2 и C5 не детектировались из-за значительного уширения соответствующих ¹³C сигналов, вызванного динамическим превращением циклических форм друг в друга. Однако, наличие спин-спинового взаимодействия между

углеродом метильной группы C6' и $^{15}\text{N}7$ однозначно подтверждает строение циклического изомера **4T**- ^{15}N (схема 3).

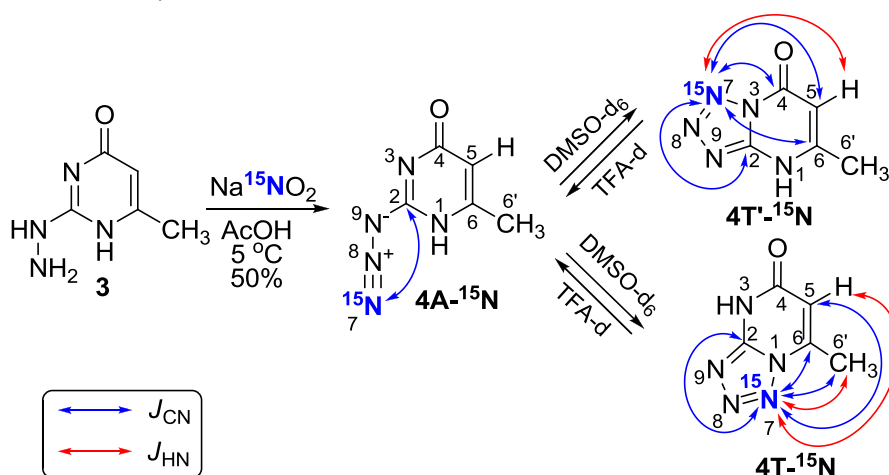


Схема 3. Включение атома ^{15}N в структуры **4A**- ^{15}N , **4T'**- ^{15}N и **4T**- ^{15}N .

Несмотря на то, что изомеризация тетразолов **4T**- ^{15}N и **4T'**- ^{15}N друг в друга протекает через структуру **4A**- ^{15}N , азидо-форма в растворе DMSO- d_6 не наблюдалась. Таким образом, можно сделать вывод, что концентрация изомера **4A**- ^{15}N в этих условиях не превышает 0.1%.

Для стабилизации азида **4A**- ^{15}N к раствору смеси соединений **4T**- ^{15}N и **4T'**- ^{15}N была добавлена дейтерированная трифторуксусная кислота. При этом объемное соотношение DMSO- d_6 /TFA-d варьировалось в диапазоне от 9:1 до 2:3. Наибольшая концентрация открытой формы **4A**- ^{15}N (29%) наблюдалась при наибольшей доле TFA в растворе (табл. 3). Изменение параметров процессов химического обмена между различными изоформами **4**- ^{15}N , вызванное добавлением кислоты, привело к значительному уменьшению полуширины сигналов C2 и C5 соединения **4T'**- ^{15}N и позволило измерить J_{CN} для этих ядер. Химические сдвиги ^{13}C сигналов соединений **4T**- ^{15}N и **4T'**- ^{15}N при добавлении TFA-d в DMSO- d_6 изменялись незначительно, что облегчило процедуру отнесения сигналов этих соединений при различных концентрациях TFA-d.

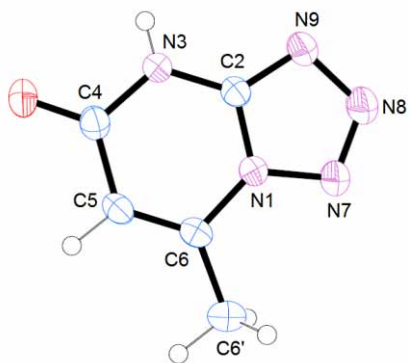


Рис. 2. Данные PCA вещества **4T**. ^{13}C сигналы соединений **4T**- ^{15}N и **4T'**- ^{15}N при добавлении TFA-d в DMSO- d_6 изменялись незначительно, что облегчило процедуру отнесения сигналов этих соединений при различных концентрациях TFA-d.

Необходимо отметить, что проведение PCA позволило установить строение только одного из трех возможных изомеров, который существует в кристаллическом виде (рис. 2), хотя нами было установлено, что в растворе существуют все три возможные формы.

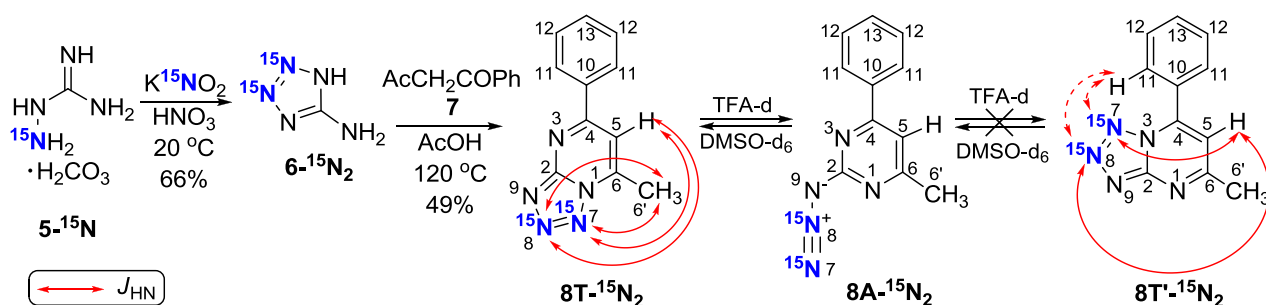
Анализ ЯМР-спектров образца **4A**- ^{15}N в растворе TFA-d выявил, что в этих условиях азидная форма является доминирующей, а из тетразольных изомеров в растворе присутствует только **4T**- ^{15}N и его концентрация составляет 4% (табл. 3). Строение соединения **4A**- ^{15}N было подтверждено на основании спин-спинового взаимодействия между ядрами углерода C2 и азота N7 ($^3J_{\text{CN}} = 0.6$ Гц). Кроме того, сигнал атома $^{15}\text{N}7$ (табл. 4) наблюдается в области, характерной для азидазинов. Детектирование и измерение КССВ ^{13}C - ^{15}N для соединения **4T**- ^{15}N в TFA-d оказалось невозможным из-за низкой концентрации этой изоформы. Однако, амплитудно-модулированные спин-эхо эксперименты выявили наличие спин-спинового взаимодействия с ядром $^{15}\text{N}7$ протона H5 и протонов метильной группы при атоме C6', что позволило доказать структуру тетразоло[1,5-*a*]пиримидина **4T**- ^{15}N . Следует подчеркнуть, что

амплитуды дальних КССВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$, измеренные для соединения **4T**- ^{15}N в растворах DMSO-d_6 и TFA-d , совпадают в пределах экспериментальной ошибки (табл. 4). Также важно отметить, что проведенные эксперименты в смесях $\text{DMSO-d}_6/\text{TFA-d}$ позволили достоверно зафиксировать сразу три таутомерные формы **4T'**- ^{15}N , **4T**- ^{15}N и **4A**- ^{15}N в растворах и показать эффективность использования дальних КССВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ в исследовании азидо-тетразольного равновесия.

Таким образом, нами был разработан селективный метод введения изотопной метки ^{15}N в молекулу тетразоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов и тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов и показано, что использование дальних КССВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ позволяет установить положение азидо-тетразольного равновесия и тип сочленения азольного и азинового фрагментов при циклизации соответствующих гетарилазидов. Преимуществом анализа дальних КССВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ перед РСА является то, что предложенный метод позволяет устанавливать структуру соединений в смесях и следить за динамическими процессами, не требует получения образца в виде монокристалла. Анализ дальних КССВ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ более чувствительный метод, чем анализ КССВ $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$, и, как следствие, требует меньшего количества образца и меньшего количества приборного времени.

2.1.1.2. Синтез $^{15}\text{N}_2$ -тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов на основе обогащенного ^{15}N 5-аминотетразола

Альтернативный подход к синтезу к тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов включает в себя конденсацию пиримидинового цикла на основе 5-аминотетразола. В этом случае для введения атома ^{15}N в тетразольный фрагмент необходимо использовать меченый 5-аминотетразол. Включение изотопа ^{15}N во второе положение 5-аминотетразола может быть реализовано обработкой аминогуанидина меченой азотистой кислотой или при взаимодействии



Ключевые константы для структуры **8T'**- $^{15}\text{N}_2$, которые наблюдались бы в случае образования данного соединения, отмечены пунктирной стрелкой.

Схема 4. Синтез изотопномеченых соединений **8A**- $^{15}\text{N}_2$ и **8T'**- $^{15}\text{N}_2$.

^{15}N -аминогуанидина **5**- ^{15}N с HNO_2 . Объединение этих двух подходов позволило синтезировать [$^{15}\text{N}_2$]-5-аминотетразол **6**- $^{15}\text{N}_2$, содержащий сразу две изотопные метки в гетероцикле. Дальнейшая конденсация соединения **6**- $^{15}\text{N}_2$ с бензоилацетоном **7** дала тетразоло[1,5-*a*]пиримидин **8T**- $^{15}\text{N}_2$ (^{15}N , 86% по каждому атому; схема 4). Следует отметить, что использование мономеченого [$2-^{15}\text{N}$]-5-аминотетразола дает смесь изотопомеров. Рассеивание изотопной метки приводит к понижению чувствительности в определении гетероядерных констант. Использование дважды меченого соединения **6**- $^{15}\text{N}_2$, напротив, позволяет получить $^{15}\text{N}_2$ -тетразоло[1,5-*a*]пиримидин, гомогенный по изотопному составу.

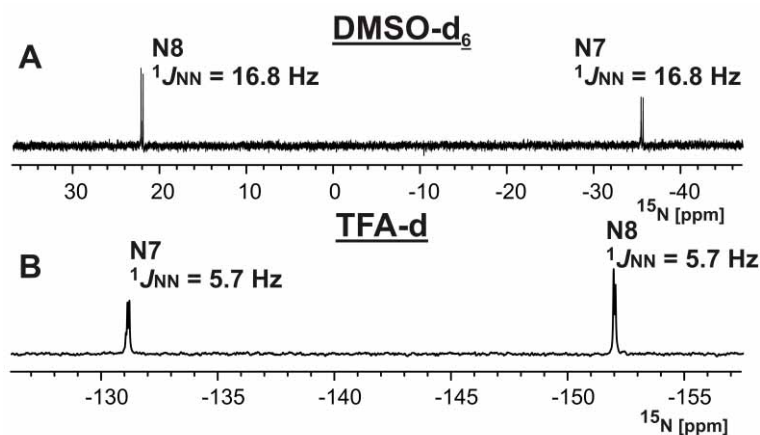


Рис. 3. ^{15}N ЯМР-спектры соединения $8\text{-}^{15}\text{N}_2$ в DMSO-d_6 (A) и TFA-d (B).

Полученный образец соединения $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$ был исследован методом ЯМР в растворах DMSO-d_6 и TFA-d . В 1D ^{15}N ЯМР-спектре $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$, зарегистрированном в DMSO-d_6 , наблюдаются два дублета с КССВ $J_{\text{NN}} \sim 16.8$ Гц, что подтверждает введение двух ^{15}N изотопных меток в положения N7 и N8 тетразольного фрагмента (рис. 3A). При этом, сигналы ядер $^{15}\text{N7}$ (δ –35.6 м.д.) и $^{15}\text{N8}$ (δ 22.0 м.д.) регистрируются в области, характерной для конденсированных тетразолазинов.

Строение соединения $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$ в растворе DMSO-d_6 было установлено на основании анализа КССВ $^1\text{H-}^{15}\text{N}$. Использование спин-эхо экспериментов с селективной инверсией намагниченности ядер ^{15}N позволило наблюдать дальние J_{HN} между протонами метильной группы C6'H_3 и двумя мечеными атомами азота ($^4J_{\text{N7H}} \sim 0.20$ Гц, $^5J_{\text{N8H}} \sim 0.08$ Гц, схема 4). Полученные результаты доказывают, что конденсация $^{15}\text{N}_2$ -аминотетразола $6\text{-}^{15}\text{N}_2$ с бензоилацетоном **7** дает тетразолопиримидин $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$, поскольку в случае образования альтернативной структуры $8\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}_2$ гетероядерные взаимодействия $^4J_{\text{N7H6'}}$ и $^5J_{\text{N7H6'}}$ должны отсутствовать (схема 4). Этот результат также показывает эффективность анализа $^4J_{\text{NH}}$ и $^5J_{\text{NH}}$ как метода для определения типа аннелирования азольного цикла к азиновому фрагменту в тетразолазо[1,5-*a*]пиримидинах.

Количественное измерение КССВ $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ в растворе DMSO-d_6 для соединения $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$ подтверждает выводы о строении этого вещества, полученные на основе анализа констант $^1\text{H-}^{15}\text{N}$. Так, взаимодействие $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ наблюдается у атомов C2, C5, C6 и C6'. В случае образования альтернативной структуры $8\text{T}'\text{-}^{15}\text{N}_2$ КССВ $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ должны были регистрироваться у сигналов C4 и C7, при этом у атома C6' константы $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ должны отсутствовать.

Химические сдвиги сигналов $^{15}\text{N7}$ и $^{15}\text{N8}$ (δ –131.3 и –151.9 м.д. соответственно) в растворе TFA-d свидетельствовали о полной перегруппировке тетразольного изомера $8\text{T-}^{15}\text{N}_2$ в открытую форму $8\text{A-}^{15}\text{N}_2$ (рис. 3B). Отнесение сигналов в 1D ^{15}N ЯМР-спектре соединения $8\text{A-}^{15}\text{N}_2$ было проведено на основании анализа химических сдвигов. Отсутствие КССВ $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ в 1D ^1H ЯМР-спектре и наличие единственной константы $^{13}\text{C-}^{15}\text{N}$ в спектре ^{13}C у сигнала атома C2 однозначно подтверждает строение азида $8\text{A-}^{15}\text{N}_2$.

Таким образом, нами был разработан метод селективного введения двух атомов ^{15}N в азольный цикл тетразолазо[1,5-*a*]пиримидинов и показано, что введение двух меток не мешает анализу дальних КССВ $^1\text{H-}^{15}\text{N}$, которые являются эффективным приемом в установлении типа аннелирования азольного и азинового циклов.

2.1.2. Синтез ^{15}N -тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов с использованием обогащенного азид натрия и исследование перегруппировки Димрота в ряду тетразоло[1,5-*a*]азинов

Реакция азид натрия с производными азинов, содержащими атом галогена в α -положении к гетероциклическому атому азота, дает азиды, способные в дальнейшем участвовать в процессе азидо-тетразольной таутомерии, и является еще одним методом синтеза тетразолоазинов. Именно этот подход был опробован для синтеза меченых тетразоло[1,5-*a*]пиримидинов.

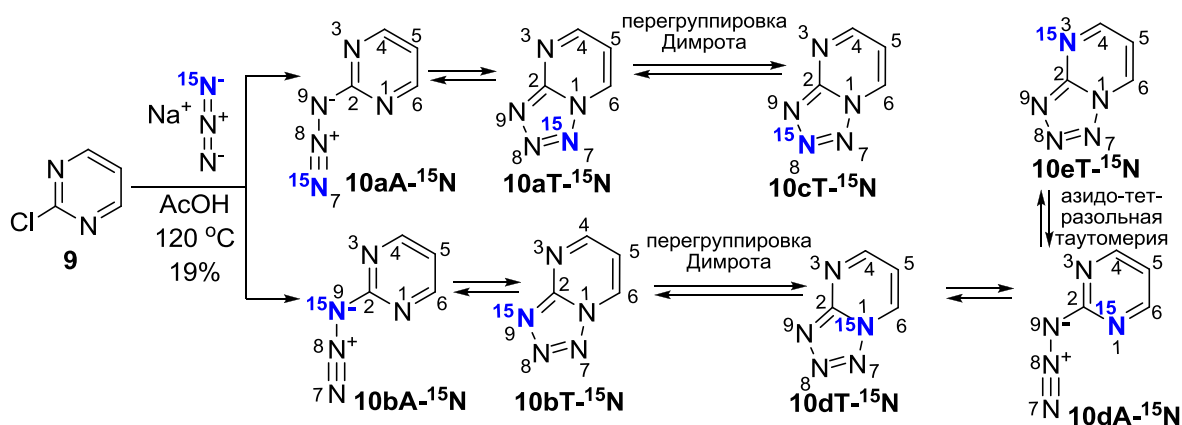


Схема 5. Синтез тетразоло[1,5-*a*]пиримидина $10\text{T-}^{15}\text{N}$ с использованием меченого азид натрия.

Для проверки возможности использования этого подхода в качестве инструмента синтеза меченых гетероциклических производных, мы использовали реакцию незамещенного 2-хлорпиримидина **9** с обогащенным атомом ^{15}N азидом натрия (схема 5). Согласно данным

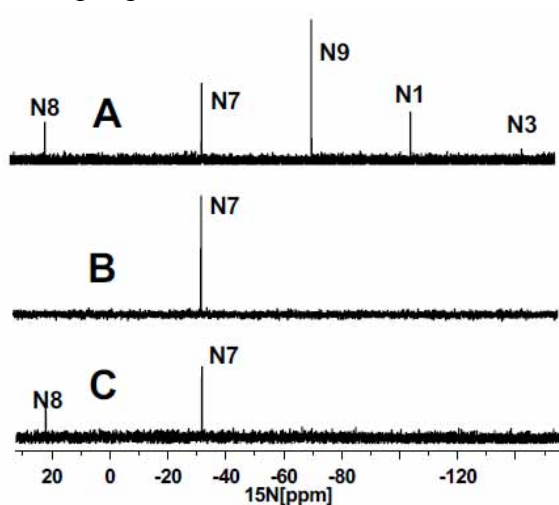


Рис. 4. ^{15}N ЯМР-спектры смеси изотопомеров $10\text{aT-}^{15}\text{N}$, $10\text{bT-}^{15}\text{N}$, $10\text{cT-}^{15}\text{N}$, $10\text{dT-}^{15}\text{N}$ и $10\text{eT-}^{15}\text{N}$ (A); соединения $10\text{aT-}^{15}\text{N}$ (B); смеси изотопомеров $10\text{aT-}^{15}\text{N}$ и $10\text{cT-}^{15}\text{N}$ (C).

^1H ЯМР-спектроскопии, полученное вещество в растворе DMSO-d_6 представляет собой тетразол с небольшой примесью азид в соотношении 96:4. Эквивалентность концевых атомов азота в анионе азид давала основание предполагать, что в результате реакции будут образовываться два изотопомера $10\text{aT-}^{15}\text{N}$ и $10\text{bT-}^{15}\text{N}$, содержащие атом ^{15}N в положениях 7 и 9 тетразольного цикла, что приведет к появлению в спектре ^{15}N ЯМР двух сигналов. Однако в 1D ^{15}N ЯМР-спектре полученного продукта, зарегистрированном в DMSO-d_6 при отсутствии азидоформы $10\text{A-}^{15}\text{N}$, наблюдалось пять различных сигналов N3 ($\delta = -142.2$ м.д.) N1 ($\delta = -103.9$ м.д.), N7 ($\delta = -31.8$ м.д.), N8 ($\delta = 22.3$ м.д.) и N9 ($\delta = -69.6$ м.д.) (рис. 4A). Это наблюдение соответствует тому, что в результате реакции произошло перераспределение метки – образовались пять различных изотопомеров: $10\text{aT-}^{15}\text{N}$, $10\text{bT-}^{15}\text{N}$, $10\text{cT-}^{15}\text{N}$, $10\text{dT-}^{15}\text{N}$ и $10\text{eT-}^{15}\text{N}$ (схема 5), и все возможные положения в тетразолопиримидиновом цикле оказались помеченными изотопом ^{15}N .

Отнесение сигналов в 1D ^{15}N ЯМР-спектре смеси изотопомеров **10aT- ^{15}N** , **10bT- ^{15}N** , **10cT- ^{15}N** , **10dT- ^{15}N** и **10eT- ^{15}N** удалось провести на основании ^{15}N спектров ЯМР отдельных компонентов, которые были получены селективным синтезом (см. ниже).

Образование двух изотопомеров **10cT- ^{15}N** и **10dT- ^{15}N** , можно объяснить тем, что соединения **10aT- ^{15}N** и **10b- ^{15}N** подвергаются перегруппировке Димрота, механизм которой на примере превращения соединения **10aT- ^{15}N** в изотопомер **10cT- ^{15}N** представлен на схеме 6.

Дополнительное перераспределение изотопной метки, приводящее к структуре **10eT- ^{15}N** , вероятно, связано с процессом азида-тетразольной таутомерии при котором соединение **10dT- ^{15}N** переходит в соответствующий ему азид **10dA- ^{15}N** , содержащий метку ^{15}N в одном из двух возможных положений пиридинового цикла. Обратный процесс циклизации азида **10dA- ^{15}N** в тетразол может протекать с одинаковой вероятностью как по меченому так и по немеченому положению пириимидина приводя либо обратно к соединению **10dT- ^{15}N** или к соединению **10eT- ^{15}N** (схема 5).

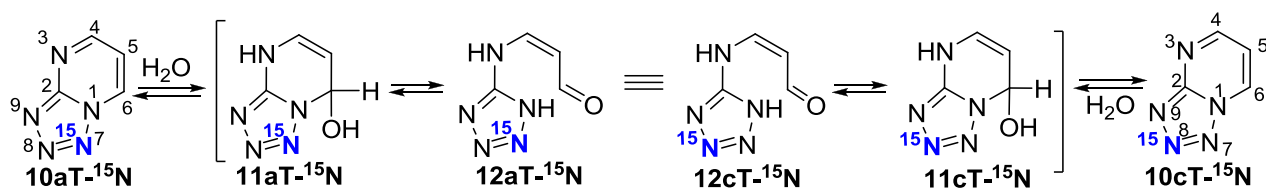


Схема 6. Перегруппировка Димрота на примере превращения **10aT- ^{15}N** в **10cT- ^{15}N** .

Для подтверждения гипотезы о перегруппировке Димрота при нуклеофильном замещении нами был осуществлен селективный синтез соединения **10aT- ^{15}N** из соответствующего 2-гидразинопириимидина **13** (схема 7). Образование одного изотопомера подтверждают данные 1D ^{15}N ЯМР-спектра, в котором регистрируется единственный сигнал при -31.8 м.д., соответствующий атому $^{15}\text{N}7$ (рис. 4В).

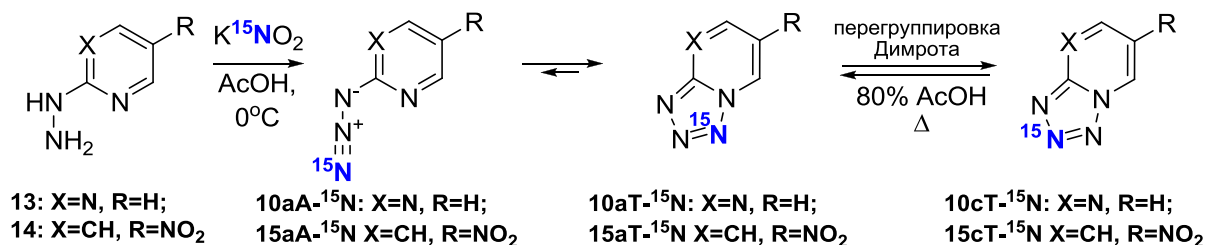


Схема 7. Селективный синтез изотопомера **10aT- ^{15}N** и перегруппировка Димрота в нем.

Полученный изотопомер **10aT- ^{15}N** при кипячении в 80% водной уксусной кислоте превращался в тетразолопириимидин **10cT- ^{15}N** (схема 7), что было установлено на основании 1D ^{15}N ЯМР-спектра (рис. 4С), в котором, помимо сигнала атома азота N7, наблюдается сигнал при 22.3 м.д., соответствующий атому N8. Сигнал при -69.6 м.д. был отнесен к тетразольному азоту N9, а сигнал при -142.2 м.д. – к пиридиноному атому N3, на основании химических сдвигов. Оставшийся сигнал в пограничной области при -103.9 м.д., принадлежит атому азота N1, содержащемуся как в тетразольном, так и в пиридиноном циклах.

Перегруппировка Димрота была нами зафиксирована для других тетразолоазинов. Так, подобный случай наблюдался для полученного из гидразинопириимидина **14** нитротетразоло[1,5-а]пиридина **15aT- ^{15}N** , который при кипячении в водной уксусной кислоте или в присутствии NaOH превращался в изотопомер **15cT- ^{15}N** (схема 7). Кроме того, изомеризация наблюдалась при хранении образца в растворе DMSO- d_6 . В данном случае была получена смесь соединений **15aT- ^{15}N** и **15cT- ^{15}N** в соотношении 1:1.

Таким образом, нами была обнаружена ранее не описанная перегруппировка Димрота в ряду тетразолазинов и установлено, что вследствие данной перегруппировки взаимодействие ^{15}N азида натрия с 2-хлорпиримидином и 2-бром-5-нитропиридином не позволяет получить селективно меченые соединения.

2. Разработка методов включения атомов ^2H , ^{13}C и ^{15}N в структуру 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов

2.1. Синтез меченых 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов

Ранее* нами с использованием меченого амингуанидина **5- ^{15}N** был получен ^{15}N -амино-1,2,4-триазол **16- ^{15}N** , который может выступать в качестве донора атома ^{15}N и может быть использован в синтезе более сложных конденсированных соединений. В данной работе мы использовали этот подход для синтеза меченого 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина **19a- ^{15}N** , который был получен при взаимодействии аминотриазола **16- ^{15}N** и формилпроизводного **17** (схема 8). В результате был получен 7-амино-6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин, который содержит изотопную метку в положении один азольного цикла. Последующий гидролиз соединения **18- ^{15}N** позволил получить соединение **19a- ^{15}N** с выходом 48%.

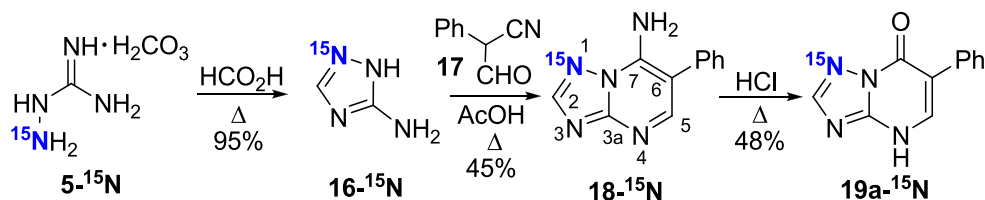


Схема 8. Синтез ^{15}N -1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **19a- ^{15}N** .

Таким образом, нами был разработан эффективный и селективный метод для введения атома ^{15}N в азольный фрагмент 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов.

Особое место среди производных 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-онов занимают структуры, содержащие в шестом положении нитрогруппу. Интерес к данным соединениям обусловлен тем, что их основе обнаружены различные соли, проявляющие широкий спектр противовирусной активности. Однако механизм действия этих солей не установлен. Одним из подходов к решению этой проблемы является использование соединений, содержащих различные типы стабильных изотопов. В данной работе нами был разработан метод синтеза 6-нитро-5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она, включающего изотопы ^2H , ^{13}C , ^{15}N (схема 9).

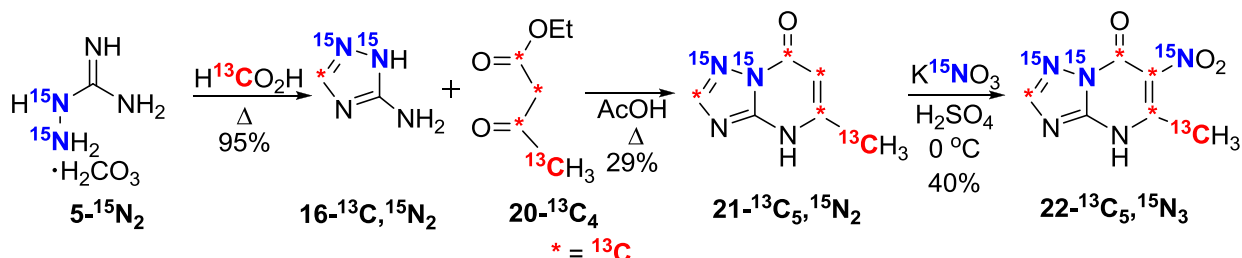


Схема 9. Синтез меченого 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина **22- $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_3$** .

Использование амингуанидина **5- $^{15}\text{N}_2$** и меченой ^{13}C -муравьиной кислоты позволило получить 5-амино-1,2,4-триазол **16- ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$** , содержащий в своей структуре несколько мече-

* Chupakhin O.N., Ulomsky E.N., Deev S.L., Rusinov V.L. // *Synth. Comm.*, **2001**, 31, 2351–2355

ных атомов. Аминогуанидин **5**- $^{15}\text{N}_2$ был получен с выходом 80% при взаимодействии сульфата $^{15}\text{N}_2$ -гидразина (^{15}N , 98%) и S-метилизотиомочевина. Последующая конденсация амина **16**- ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$ с обогащенным ацетоуксусным эфиром **20**- $^{13}\text{C}_4$ привела к азолоазину **21**- $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$. Наличие атомов ^{15}N и ^{13}C в соединении **21**- $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$ подтверждается данными 1D ^1H ЯМР-спектроскопии. Так, сигналы атома H2 демонстрируют взаимодействие с $^{13}\text{C}_2$ и двумя мечеными атомами азота ($^1J_{\text{CH}} = 209$ Гц, $^2J_{\text{NH}} = 15.9$ Гц и $^3J_{\text{NH}} = 6.2$ Гц). Обработка соединения **21**- $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$ K^{15}NO_3 в среде концентрированной серной кислоты позволила получить с выходом 40% нитропроизводное **22**- $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_3$, которое в дальнейшем может быть превращено в биологически активные соли.

Таким образом, нами были разработаны методы включения изотопа ^{15}N в положение 1 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов, а также введения атомов ^{15}N и ^{13}C в различные положения 6-нитро-5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов; наблюдаемые КССВ ^1H - ^{15}N и ^{13}C - ^{15}N подтверждают строение полученных соединений и селективное введение меток.

2.2. Синтез меченых производных триазавирина (натриевой соли 6-нитро-2-метилтио-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она)

Триазабирин (TZV) – противовирусный препарат, относящийся к классу 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов, – проходит третью фазу клинических испытаний и эффективен в отношении различных штаммов вируса гриппа, включая штаммы H5N1 (вирус гриппа птиц). Для исследования особенностей метаболизма и фармакокинетики были предложены различные варианты включения стабильных изотопов в структуру данного препарата.

Схема синтеза триазавирина (TZV) основана на реакции азосочетания соли диазония **23** с нитроуксусным эфиром **24** (схема 10). Соединение **23** получают из соответствующего 3-амино-5-метилтио-1,2,4-триазола и азотистой кислоты. При этом соль диазония не выделяют, а используют в растворе. Таким образом, включение атомов ^{15}N и ^2H в структуру соединений **23** и **24** позволит получить изотопномеченый TZV.

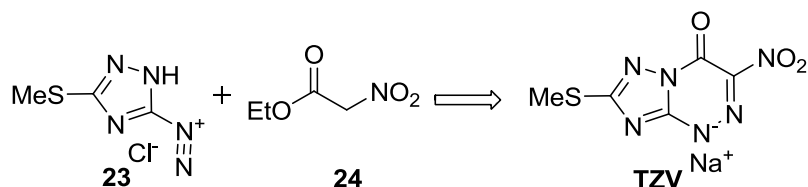


Схема 10. Схема синтеза TZV.

В качестве донора изотопа ^{15}N для синтеза меченого этилнитроацетата **24**- ^{15}N был выбран обогащенный нитрит натрия (^{15}N , 98%), который при взаимодействии с ацетоуксусным эфиром в среде уксусной кислоты образовывал нитрозопроизводное **25a**- ^{15}N , существующее в растворе DMSO- d_6 в виде оксима **25b**- ^{15}N (схема 11). Обработка соединения **25b**- ^{15}N бихроматом натрия дала меченый нитроуксусный эфир **24**- ^{15}N . Анализ методом ^1H ЯМР показал, что в результате реакции окисления нами была получена смесь соединений **24**- ^{15}N и **25b**- ^{15}N в соотношении 3:1 соответственно. В последующем эта смесь была использована в реакции азосочетания без дополнительной очистки. Образование соединения **24**- ^{15}N подтверждалось наличием в ^1H ЯМР-спектре дополнительного расщепления сигнала метиленовой группы, возникающего за счет спин-спинового взаимодействия с ядром ^{15}N ($^2J_{\text{HN}} = 2.0$ Гц).

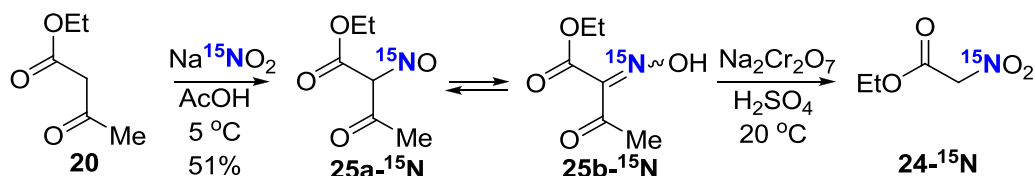


Схема 11. Синтез меченого нитроуксусного эфира **24-¹⁵N**.

Для введения изотопа ¹⁵N в азольный цикл соли диазония **23** разработана схема синтеза, основанная на использовании аминогуанидина **5-¹⁵N** (¹⁵N, 86 %) (схема 12). При обработке соединения **5-¹⁵N** роданистым аммонием образовывался тиюразол **26-¹⁵N**. Положение изотопной метки в соединении **26-¹⁵N** определено схемой синтеза. На следующем этапе получения изотопно-модифицированной соли диазония **23** было проведено селективное включение атомов ²H с помощью реакции алкилирования триазола **26-¹⁵N** дейтерированным йодистым метилом (²H, 98%). В результате было получено соединение **27-²H₃,¹⁵N**. Наличие изотопных меток в данном случае было подтверждено данными масс-спектрометрии ($[M+H]^+$ 135.05). Дальнейшее превращение гетариламина **27-²H₃,¹⁵N** в соль диазония **23-²H₃,¹⁵N₂** происходило под действием ¹⁵N-азотистой кислоты, генерированной из Na¹⁵NO₂ (¹⁵N, 98%) в кислой среде. Использование ¹⁵N-меченой азотистой кислоты в процессе диазотирования амина **27-²H₃,¹⁵N** привело к введению дополнительной метки ¹⁵N в структуру **TZV**.

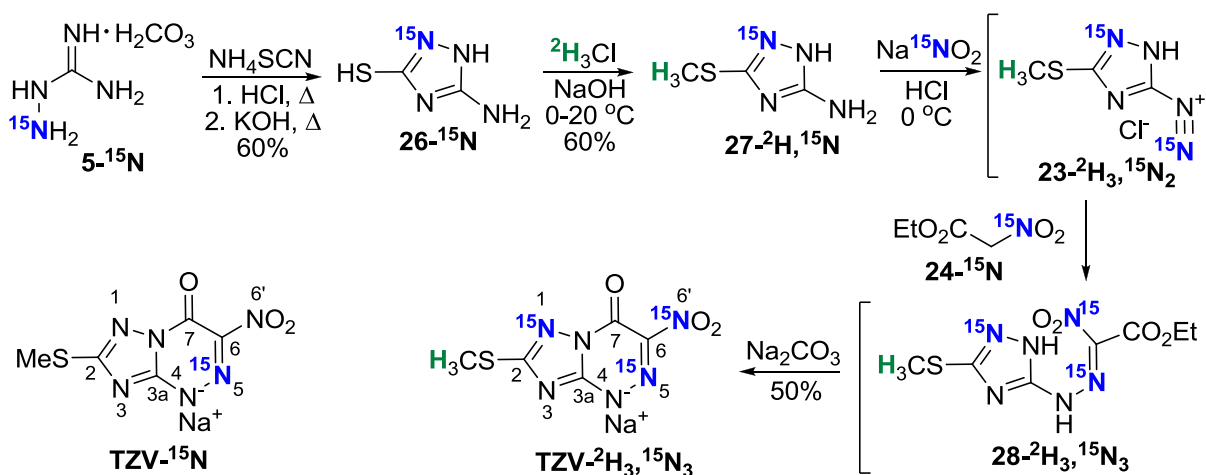


Схема 12. Синтез противовирусного препарата **TZV-²H₃,¹⁵N₃**.

Проведение реакции сочетания между солью диазония **23-²H₃,¹⁵N₂** и нитроуксусным эфиром **24-¹⁵N** в присутствии раствора Na₂CO₃ позволило синтезировать обогащенный изотопами ¹⁵N и ²H противовирусный препарат триазавирин **TZV-²H₃,¹⁵N₃**, (схема 12).

В 1D ¹⁵N ЯМР-спектре соединения **TZV-²H₃,¹⁵N₃** сигналы атомов N5 ($\delta = 16.68$ м.д.) и N6' ($\delta = -12.08$ м.д.) регистрируются в виде дублетов с КССВ $^2J_{NN} = 6.3$ Гц, а сигнал атома N1 имеет вид синглета. Такая спектральная картина подтверждает присутствие трех изотопных меток ¹⁵N в соединении **TZV-²H₃,¹⁵N₃**. Отнесение сигналов атомов азота изотопномеченого триазавирина (**TZV-²H₃,¹⁵N₃**) было проведено с учетом мультиплетности сигналов, а также на основании сравнения химических сдвигов ¹⁵N5 ($\delta = 16.70$ м.д.) меченого **TZV-¹⁵N**, полученного ранее. Присутствие атомов ¹⁵N в структуре соединения **TZV-²H₃,¹⁵N₃** приводит к появлению гетероядерных КССВ ¹³C-¹⁵N у сигналов атомов углерода C2 ($\delta = 166.3$ м.д., $^2J_{CN1} = 5.1$ Гц), C3a ($\delta = 160.7$ м.д., $^2J_{CN5} = 2.1$ Гц, $^2J_{CN} = 0.4$ Гц), C6 ($\delta = 145.2$ м.д., $^1J_{CN5} = 1.8$

Гц, $^1J_{\text{CN}6'}$ 23.4 Гц, $^3J_{\text{CN}1}$ 1.4 Гц) и C7 ($\delta = 143.4$ м.д., $^2J_{\text{CN}5} = 1.3$ Гц, $^2J_{\text{CN}6'} = 5.3$ Гц, $^2J_{\text{CN}1} = 3.3$ Гц). Кроме того, в углеродном спектре для сигналов атомов C2' ($\delta = 13.4$ Гц, $^1J_{\text{DC}} = 21$ Гц) и C2 ($^3J_{\text{CD}} = 0.7$ Гц) наблюдается дополнительная мультиплетная составляющая, связанная с наличием спин-спинового взаимодействия $^2\text{H}-^{13}\text{C}$. Измерение КССВ $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ проведено на основании 1D ^{13}C ЯМР-экспериментов, зарегистрированных с селективной развязкой от ядер ^{15}N . Полученные результаты доказывают селективное включение в структуру **TZV** трех меток ^{15}N .

Использование в KS^{13}CN (^{13}C , 95%) и $^2\text{H}_3^{13}\text{Cl}$ (^{13}C , 95%; ^2H , 99%) позволило ввести дополнительно два атома ^{13}C в структуру триазавирина (схема 13).

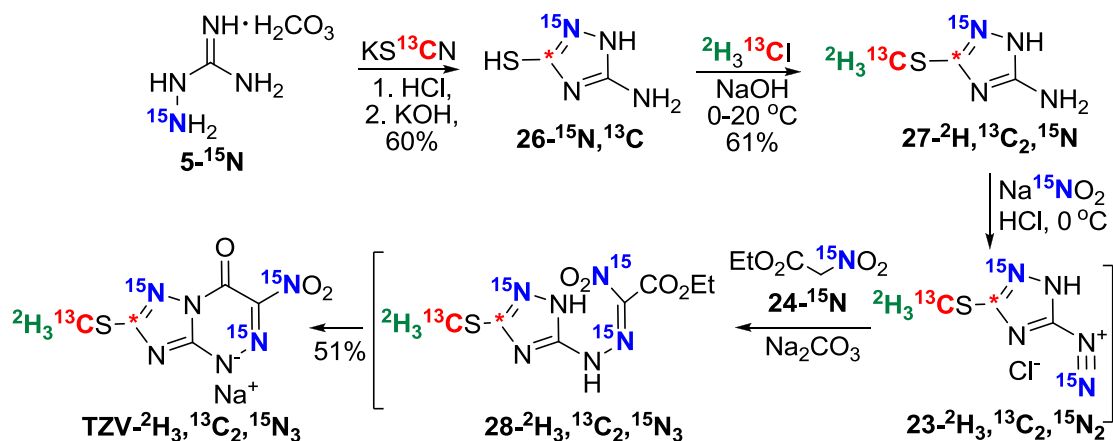


Схема 13. Синтез противовирусного препарата **TZV- $^2\text{H}_3$, $^{13}\text{C}_2$, $^{15}\text{N}_3$** .

Наличие атомов ^2H , ^{13}C и ^{15}N в гетариламине **27- $^2\text{H}_3$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_2$** подтверждают данные масс-спектрометрии ($[\text{M}+\text{H}]^+$ 137.05). Особенностью данной схемы явилось то, что было использовано соединение **5- ^{15}N** со степенью обогащения по атому ^{15}N 98%. Общий выход соединения **27- $^2\text{H}_3$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_2$** составил 30% в расчете на аминогуанидин. Далее полученную соль диазония **23- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_2$, $^{13}\text{C}_2$** ввели в реакцию сочетания с меченым нитроуксусным эфиром **24- ^{15}N** . В результате реакции с выходом 45% был выделен триазавирин **TZV- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$, $^{13}\text{C}_2$** , обогащенный различными типами изотопов (схема 13). В спектре 1D ^{15}N ЯМР соединения **TZV- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$, $^{13}\text{C}_2$** сигналы атомов N5 (δ 16.7 м.д.) и N6' (δ -12.1 м.д.) регистрируются в виде дублетов с КССВ $^2J_{\text{NN}}$, 6.3 Гц, тогда как сигнал атома N1 (δ -121.58 м.д.) представлен виде мультиплета за счет взаимодействия $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ с мечеными атомами $^{13}\text{C}2$ и $^{13}\text{C}2'$ ($^1J_{\text{CN}} = 5.0$ Гц и $^3J_{\text{CN}} = 2.5$ Гц соответственно). Таким образом, структура сигнала N1 подтверждает присутствие двух меченых атомов углерода в молекуле триазавирина.

В результате нами был получен образец противовирусного препарата – триазавирин, содержащий атомы ^2H , ^{13}C и ^{15}N в различных положениях гетероциклического кольца и в боковых группах. Полученные образцы **TZV- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$** и **TZV- $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$, $^{13}\text{C}_2$** представляют интерес для исследования фармакокинетики, особенностей метаболизма и механизма действия противовирусного препарата триазавирин методом масс-спектрометрии и ЯМР.

2.3. Исследование реакции гликозилирования с помощью ^{15}N меченного производного на примере синтеза аналогов ацикловира на основе 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов

Одним из важных направлений использования соединений, меченных стабильными изотопами (^2H , ^{13}C и ^{15}N), является применение их для изучения механизмов химической реакции. В данной работе представлен пример использования соединения **19a**- ^{15}N для изучения реакции 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов **19a-c**, с (2-ацетоксиэтокси)метилацетатом **29** (схема 14).

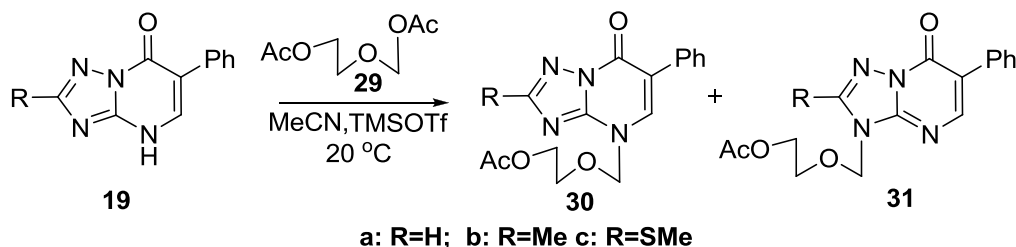


Схема 14. Взаимодействие гетероциклов **19** с соединением **29**.

Установлено, что взаимодействие протекает в условиях гликозилирования Форбрюггена в присутствии триметилсилил трифторметансульфоната (TMSOTf). Соотношение образующихся продуктов **30** и **31** зависит от времени проведения реакции (табл. 5). В начале реакции смесь состоит главным образом из N3-изомера, доля которого падает с течением времени, а доля N4-изомера возрастает. Следовательно, N3-гликозид – это продукт кинетического контроля, а N4-гликозид – продукт термодинамического контроля.

Табл. 5. Зависимость соотношения продуктов N3:N4 от времени реакции.

Исходное соединение	R	время					
		1 минута	5 минут	10 минут	2 часа	1 сутки	5 суток
19a	H	90:10	81:19	75:25	60:40	42:58	37:63
19b	Me	89:11	84:16	81:19	71:29	45:55	30:70
19c	SMe	80:20	77:23	72:28	55:45	34:66	16:84

Кроме того, была обнаружена способность соединений **30** и **31** обратимо изомеризоваться друг в друга в смеси ацетонитрила и TMSOTf (схема 15). Изомеризация может быть связана как с внутримолекулярной миграцией (2-ацетоксиэтокси)метильного фрагмента в N3-производном (путь А на схеме 16), так и с распадом N3-гликозида до исходного гетероцикла и карбокатиона **32** с последующей рекомбинацией в N4-изомер (путь В на схеме 16).

Для того, чтобы сделать выбор между двумя направлениями А и В, нами был проведен эксперимент с изотопномеченными соединениями. Для этой цели нами был использован меченый 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-он **19a**- ^{15}N , полученный ранее. Изотопное обогащение образца составило 86%, что подтверждается спектром ЯМР (рис. 5А). Введение меченого гетероцикла **19a**- ^{15}N в реакцию трансгликозилирования соединений **30a** и **31a** привело к образованию соединений **19a** ^{15}N , **30** ^{15}N и **31** ^{15}N , изотопное содержание ^{15}N в которых составило около 43% для каждого соединения, что подтверждается данными ^1H ЯМР (рис. 5В, 5С и 5D соответственно). Этот результат подтверждает межмолекулярный характер изомеризации соединения **30(31)** в **31(30)**, по-

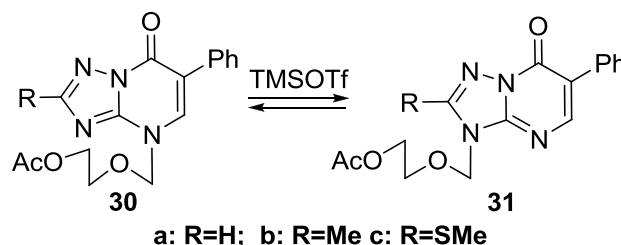


Схема 15. Обратимая изомеризация соединений **30** и **31**.

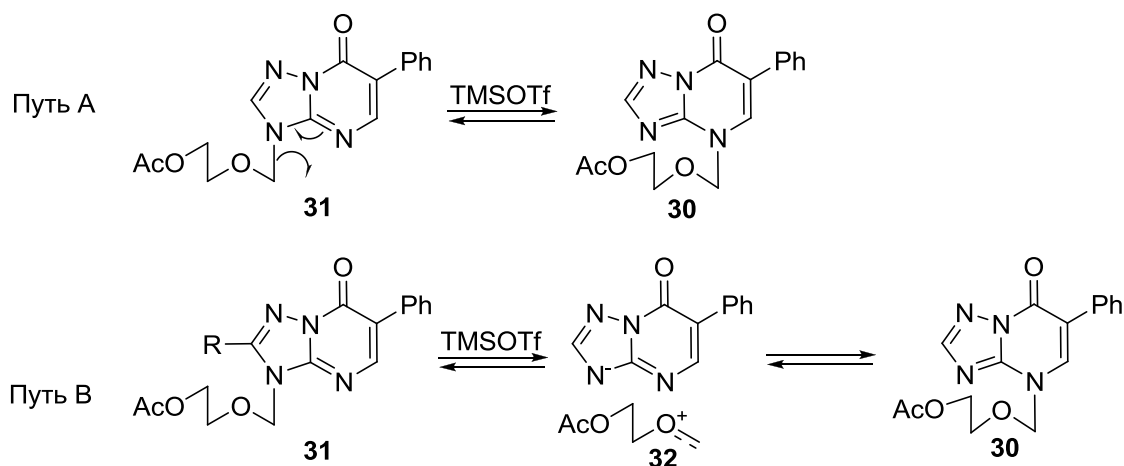


Схема 16. Два возможных механизма образования N4 гликозида при гликозилировании и транс-гликозилировании 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов.

скольку в ходе переноса гликозильного фрагмента произошло вовлечение меченого соединения в продукты реакции, что соответствует направлению В на схеме 16.

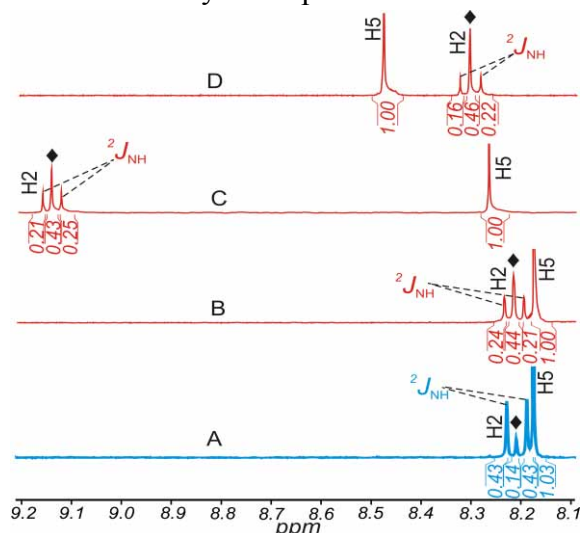


Рис. 5. Фрагмент ^1H ЯМР-спектров соединений $19\text{a-}^{15}\text{N}$ (А), $19\text{a}^\#-^{15}\text{N}$ (В), $30^\#-^{15}\text{N}$ (С), $31^\#-^{15}\text{N}$ (D). Компонент немеченого соединения отмечен черным ромбом (♦).

Таким образом, использование меченых соединений позволило установить особенности гликозилирования 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов и установить межмолекулярный характер процесса трансгликозилирования в ряду данных соединений.

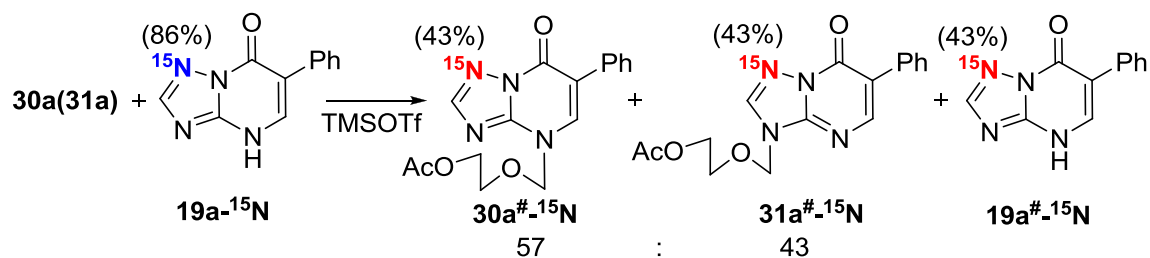


Схема 19. Изомеризация соединения $30\text{a}(31\text{a})$ в присутствии меченого гетероцикла $19\text{a-}^{15}\text{N}$.

Выводы:

1. Созданы эффективные методы селективного введения стабильных изотопов ^2H , ^{13}C и ^{15}N в структуру азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов.
2. Синтезированы образцы изотопнозамещенных азоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-а]пиримидинов, содержащих метки ^2H , ^{13}C и ^{15}N в различных положениях. Среди веществ получен препарат триазавирин, содержащий стабильные изотопы в различных положениях триазольного и триазинового циклов. Данный препарат необходим для исследования метаболизма и фармакокинетики.
3. На основе анализа КССВ ^1H – ^{15}N и ^{13}C – ^{15}N разработаны методы исследования особенностей строения и трансформаций полиазотистых гетероциклов. Данный метод позволил:
 - исследовать азидо-тетразольное равновесие при помощи анализа дальних гетероядерных констант ^1H – ^{15}N и показать применимость метода на примере исследования азидо-тетразольной таутомерии в ряду тетразоло[1,5-а]пиримидина и тетразоло[5,1-с][1,2,4]триазина;
 - установить тип аннелирования азольного и азинового циклов в 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов и 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов и открыть перегруппировку Димрота в тетразоло[1,5-а]азидах.
4. Использование соединений, меченных изотопами ^{15}N , позволило решить вопросы, связанные с механизмом гликозилирования 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов.
5. Показано, что анализ КССВ ^1H – ^{15}N и ^{13}C – ^{15}N имеет преимущества перед данными КССВ ^1H – ^{13}C и ^1H – ^1H в том, что позволяет эффективно исследовать строение полиазотистых соединений. Кроме того, в отличие от РСА, анализ КССВ ^1H – ^{15}N и ^{13}C – ^{15}N дает возможность исследовать динамические и происходящие в растворе процессы, а также позволяет исследовать смеси соединений.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях:

Публикации в рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК

1. Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Деев С.Л., Ельцов О.С., Русинов В.Л., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Чупахин О.Н. «Синтез противовирусного препарата «триазавирин» меченного изотопами ^2H и ^{15}N » // Изв. АН. Сер. хим., 2011, с. 714–717.
2. Халымбаджа И.А., Шестакова Т.С., Деев С.Л., Русинов В.Л., Чупахин О.Н., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С. «Константы спин-спинового взаимодействия ^{13}C – ^{15}N и ^1H – ^{15}N в исследовании азидо-тетразольной таутомерии в ряду 2-азидопиримидинов» // Изв. АН. Сер. хим., 2013, с. 519–526.
3. Shestakova T.S., Shenkarev Z.O., Deev S.L., Chupakhin O.N., Khalymbadzha I.A., Rusinov V.L., Arseniev A.S. «Long-range ^1H – ^{15}N J couplings providing a method for direct studies of the structure and azide-tetrazole equilibrium in a series of azido-1,2,4-triazines and azidopyrimidines» // J. Org. Chem. 2013, v. 78, p. 6975–6982.
4. Khalymbadzha I.A., Shestakova T.S., Subbotina J.O., Eltsov O.S., Rusinov V.L., Chupakhin O.N., Karpenko I.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Deev S.L. «Synthesis of acyclic nucleoside analogues based on 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-ones by one-step Vorbrüggen glycosylation» // Tetrahedron 2013, *in press*

Тезисы докладов

1. Деев С.Л., Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Ельцов О.С., Мусихина А.А., Шенкарев З.О., Кодесс М.И., Русинов В.Л., Чупахин О.Н. Синтез противовирусного препарата «триазавирин», меченного изотопами ^{15}N и ^2H Сборник трудов «Актуальные проблемы органического синтеза и анализа» Екатеринбург: Издательство УрО РАН, 2010. С. 3–7.
2. Shestakova T.S., Deev S.L., Khalymbadzha I.A., Chupakhin O.N., Rusinov V.L. «The Synthesis of $^2\text{H}_3$, $^{15}\text{N}_3$ -labeled triazavirine» International Congress on Organic Chemistry, Kazan, Russia, September 18–23, 2011, p. 384.
3. Халымбаджа И.А., Деев С.Л., Шестакова Т.С., Русинов В.Л., Чупахин О.Н. «Синтез аналогов противовирусного препарата «Ацикловир» на основе 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов» Сборник тезисов XIV молодежной конференции по органической химии. Екатеринбург, 14–18 мая 2011, с. 506–508.
4. Деев С.Л., Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Русинов В.Л., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Чупахин О.Н. «Включение изотопов ^{15}N в структуру азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов и азоло[1,5-*a*]пиримидинов как подход в исследовании строения и химических трансформаций полиазотистых гетероциклов» Сборник тезисов Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология» Екатеринбург, 4–8 июня 2012, с. У16.
5. Халымбаджа И.А., Деев С.Л., Шестакова Т.С., Русинов В.Л., Чупахин О.Н. «Определение строения продуктов адамантирования 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов методом спектроскопии ЯМР меченых изотопом ^{15}N соединений» Сборник трудов III международной конференции Техническая химия: от теории к практике. Пермь, 15–19 октября 2012. с. 314–315.
6. Деев С.Л., Шестакова Т.С., Халымбаджа И.А., Русинов В.Л., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Чупахин О.Н. «Гетероспиновые константы ^1H – ^{15}N и ^{13}C – ^{15}N в исследованиях трансформаций азоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, азоло[1,5-*a*]пиримидинов и азоло[1,5-*a*]пиридинов» III Всероссийская конференция по органической химии» посвященная 200-летию со дня рождения Н.Н. Зинина, Санкт-Петербург, 16–22 июня 2013, с. 91.
7. Шестакова Т. С., Халымбаджа И. А., Деев С. Л., Русинов В. Л., Чупахин О. Н. «Перегруппировка Димрота в ряду тетраоло[1,5-*a*]пиримидинов» Третья международная научная конференция «Новые направления в химии гетероциклических соединений» Пятигорск, Россия, 17–21 сентября 2013, с. 276.